



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts RD22220PC IB/mo	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/PEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/09694	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 01.09.2003	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 30.08.2002
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C07K1/00		
Anmelder F. HOFFMANN-LA ROCHE AG et al		
<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.</p> <p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Bescheids</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priorität</p> <p>III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Regel 66.2 a)ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</p>		
Datum der Einreichung des Antrags 05.03.2004		Datum der Fertigstellung dieses Berichts 07.01.2005
Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Bevollmächtigter Bediensteter Kronester-Frei, A Tel. +49 89 2399-8555 

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/09694

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):

Beschreibung, Seiten

1-20 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Ansprüche, Nr.

1-27 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Zeichnungen, Blätter

1/1 in der ursprünglich eingereichten Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um:

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**Internationales Aktenzeichen **PCT/EP 03/09694**

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung
- | | |
|--------------------------------|------------------------|
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche 1-25, 27 |
| | Nein: Ansprüche 26 |
| Erfinderische Tätigkeit (IS) | Ja: Ansprüche 1-25,27 |
| | Nein: Ansprüche |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (IA) | Ja: Ansprüche: 1-27 |
| | Nein: Ansprüche: |

2. Unterlagen und Erklärungen:

siehe Beiblatt

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/09694

Zu Punkt I**Grundlage des Bescheides****Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:**

- D1: SUMMERS CATHERINE A ET AL: 'Protein renaturation by the liquid organic salt ethylammonium nitrate' PROTEIN SCIENCE, Bd. 9, Nr. 10, Oktober 2000 (2000-10), Seiten 2001-2008, XP009022169 ISSN: 0961-8368
- D2: ARMSTRONG D W ET AL: 'Ionic liquids as matrixes for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.' ANALYTICAL CHEMISTRY. UNITED STATES 1 AUG 2001, Bd. 73, Nr. 15, 1. August 2001 (2001-08-01), Seiten 3679-3686, XP001156233 ISSN: 0003-2700
- D3: KULLMANN W: 'PROTEASES AS CATALYSTS FOR ENZYMIC SYNTHESSES OF OPIOID PEPTIDES' JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 255, Nr. 17, 1980, Seiten 8234-8238, XP002263435 ISSN: 0021-9258
- D4: WO 02 26772 A (HOFFMANN LA ROCHE ;JAKUBKE HANS DIETER (DE); BORDUSA FRANK (DE); R) 4. April 2002 (2002-04-04)
- D5: PARK S ET AL: 'Improved preparation and use of room-temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations.' THE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY. UNITED STATES 14 DEC 2001, Bd. 66, Nr. 25, 14. Dezember 2001 (2001-12-14), Seiten 8395-8401, XP002263436 ISSN: 0022-3263
- D6: EP-A-1 201 657 (CENTRE NAT RECH SCIENT) 2. Mai 2002 (2002-05-02)
- D7: WO 02 26701 A (ABBOTT ANDREW PETER ;CAPPER GLEN (GB); SCIONIX LTD (GB); DAVIES DA) 4. April 2002 (2002-04-04)
- D8: VAN RANTWIJK F ET AL: 'Biocatalytic transformations in ionic liquids' TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, Bd. 21, Nr. 3, März 2003 (2003-03), Seiten 131-138, XP004412613 ISSN: 0167-7799
- D9: PARK S. ET AL: 'Biocatalysis in ionic liquids - Advantages beyond green technology.' CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, (2003) 14/4 (432-437). , XP002263437
- D10: EP-A-1 348 767 (HITACHI SOFTWARE ENG) 1. Oktober 2003 (2003-10-01)

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

- D1: Die Verwendung der ionischen Flüssigkeit (Salzschmelze) EAN (Ethylammonium Nitrat) als Rückfaltungs-Additivum ist in dem 1-stufigen Renaturierungsprozess von Vorteil. Steigerung der Ausbeute in einem Verfahren zur Wiedergewinnung von denaturiertem-reduziertem Hühner-Eiweiss. Die Ergebnisse belegen, dass EAN die Fähigkeit hat, der Aggregation des denaturierten Proteins entgegenzuwirken.
- D2: Ionische Flüssigkeiten (Salzschmelzen) wurden zur Beschichtung von Matrizen für

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/09694

UV-MALDI-Untersuchungen hergenommen und mit verschiedenen Proteinen und Peptiden getestet, insbesondere Bradikinin. Die meisten der getesteten ionischen Flüssigkeiten zeigten u.a. ausgezeichnete Lösungsmittel-Eigenschaften mit hoher Vakuum-Stabilität.

- D3: Proteasen sind als Katalysatoren für enzymatische Synthesen von Opioid-Peptiden geeignet, in Beispielen wurden Papain und Chymotrypsin verwendet.
- D4: Verfahren zur biokatalytischen Modifikation von Peptiden und Proteinen unter Verwendung von Trypsin, Chymotrypsin, V8 Protease, etc.
- D5: Lipase wurde durch die Einwirkung von ionischen Flüssigkeiten nicht inaktiviert: (3-alkyl-1-methylimidazolium tetrafluoroborate zeigt Polaritäten die polaren organischen Lösungsmittels ähnlich sind. Die Lipase katalysierte Acetylation von 1-Phenylethanol war ebenso schnell/enantioselectiv in ionischen Flüssigkeiten wie Toluol. Die Lipase katalysierte (Lipase B von *Candida antarctica* (CAL-B)) Acetylierung von Glucose war regioselectiver als in ionischen Flüssigkeiten.
- D6: Imidazolium Salze können als Lösungsmittel organischen Verfahren verwendet werden, insbesondere in katalytischen Reaktionen wie die 2-Phasen-Konversion von Olefinen. Keine Information bezüglich Protein/Peptid-ähnlichen Syntheseverfahren.
- D7: Ionische Flüssigkeits-Systeme, mit Beispielen von salzschmelzen und interessanten Eigenschaften: Verwendung als hoch polare Lösungsmittel in der präparativen Chemie und als Katalysatoren. In einem Beispiel erwähnt, dass 2 Carboxy-Gruppen anwesend sein können und es wird nicht ausgeschlossen dass sowohl COOH-Gruppen als auch NH₂-Gruppen anwesend sein können, ohne jedoch explizite bevorzugt zu sein.
- D8: Verschiedenartige Enzyme sind in ionischen Flüssigkeiten/wässrigen ionischen biphasischen Flüssigkeits-Systemen katalytisch aktiv. Insbesondere Lipasen behalten ihre Aktivität im wasserfreien Milieu; die Enantioselectivität und die Stabilität sind oft besser wie in traditionellen Medien. Empfohlen für die Verwendung von Biotransformationen in Amino- und Nukleinsäuren.
- D9: Enzyme werden in ionischen Flüssigkeiten nicht inaktiviert, wie dies in organischen Lösungsmitteln der Fall ist, sie zeigen zudem eine erhöhte Stabilität, besondere Bedeutung für Proteine, Peptide als Ausgangsstoffe in Verfahren zur Herstellung Pharmaceutikas, etc.
- D10 DNA in ionischen Lösungsmitteln: Protein hergestellt durch Komplementär Bindung an 2. DNA, die einen Marker zu einer 1. DNA in einer ionischen Flüssigkeit aufweist, wobei die 1. DNA auf Substrat immobilisiert ist (DNA-Chip).
1. Gegenüber D1/D2 ist Anspruch 26 nicht mehr neu. Insbesondere gegenüber

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/09694

D1/D2 ist auszuführen, dass der Anspruch 26 in der derzeitigen sprachlichen Ausgestaltung keineswegs

eine Verwendung von ionischen Flüssigkeiten bei der enzymatisch katalysierten Peptidbindung zwischen zwei definierten Peptiden beschreibt, sondern in viel allgemeinerer Form Bezug nimmt auf *die Synthese und/oder N-terminalen Modifizierung von Peptiden, Peptidmimetika und/oder Proteinen.*

2. Die Neuheit der Ansprüche 1-25 und 27 ist gegenüber D1-D7 anzuerkennen.
3. Da die Prioritätsdokumente belegen daß allen Ansprüchen das Prioritätsrecht zugestanden werden kann. Daher sind D8 und D9 nicht weiter relevant. D10 könnte in einem anschließenden Europäischen Verfahren ggf. eine Rolle spielen (Artikel 54(3)(4) EPÜ).
4. Bei der Beurteilung der erfinderischen Tätigkeit ist unter dem Gesichtspunkt der gestellten Aufgabe,
die im Zurverfügungstellen einer weiteren alternativen Verfahren zur Peptid-und Proteinsynthese gesehen werden kann, insbesondere in Bezug auf eine Verwendung von ionischen Flüssigkeiten bei der enzymatisch katalysierten Peptidbindung zwischen zwei definierten Peptiden/Proteinen, wobei im Hinblick auf Unterdrückung von hydrolytischen und proteolytischen Nebenreaktionen, ionische Flüssigkeiten den herkömmlichen Lösungsmitteln beigemischt werden können bzw. diese völlig ersetzen können,
davon auszugehen, dass gegenüber D5, das als nächstliegender Stand der Technik angesehen werden kann, die Verwendung von ionischen Flüssigkeiten als Lösungsmittel zwar bereits bekannt war in einem Verfahren zur enzymatisch Acetylierung von Glukose (nicht Peptide/Proteine), aber auch in Verbindung mit D1/D2, ebenso wie vorteilhaften Eigenschaften bezüglich Aktivität der Proteine, **aber nicht** die erzielte Regioselektivität der Reaktion zwischen zwei Peptid/Protein-Komponenten: in der Tat beobachtet man eine nicht vorhersehbare Steigerung der Regioselektivität, die zu einer erhöhten Ausbeute führt (vgl. insbesondere Beispiele 1-4). Somit liegt die nach Artikel 33(3) PCT erforderliche erfinderische Tätigkeit für die Ansprüche 1-15, 27 vor.
5. Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in den Dokumenten D1-D5 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben.